

© Баринов Э.Ф., Сулаева О.Н., Крахоткина Е.Д., 2010

УДК 616.342-002.44-005.1:616.15

МОДУЛЯЦИЯ СЕРОТОНИНОМ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ОТВЕТА ТРОМБОЦИТОВ И ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ ОСТРОМ КРОВОТЕЧЕНИИ ИЗ ЯЗВ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ

Э.Ф.Баринов, О.Н.Сулаева, Е.Д.Крахоткина

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. – проф. Э.Ф.Баринов) Донецкого национального медицинского университета имени М.Горького

МОДУЛЯЦІЯ СЕРОТОНІНОМ ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ВІДПОВІДІ ТРОМБОЦИТІВ І ЛЕЙКОЦИТІВ ПРИ ГОСТРІЙ КРОВОТЕЧІ З ВИРАЗОК ДВНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ

Резюме. Для оцінки ролі серотоніну в патогенезі ускладнень виразкової хвороби проведена оцінка агрегації тромбоцитів та НСТ-реакції нейтрофілів (Нф) і моноцитів (Мц) у 24 пацієнтів з гострими кровотечами з дуоденальних виразок. Виявлено підвищення спонтанної агрегації тромбоцитів та зниження EC_{50} серотоніну. Проагрегантний стан тромбоцитів пов'язаний з порушенням внутрішньоклітинного Ca^{2+} -гомеостазу та підвищенням чутливості 5-НТ₂ рецепторів. Виявлено посилення спонтанної НСТ-реакції у Нф та Мц при обмеженні функціонального резерву лейкоцитів.

Ключові слова: виразкова кровотеча, серотонін, тромбоцити, лейкоцити.

Развитие язв двенадцатиперстной кишки (ДПК) и ее осложнений связывают с перестройкой локальной системы контроля, регуляторные контуры которой ассоциированы с диффузной эндокринной системой желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [1, 2]. Нарушение структурного гомеостаза стенки ДПК, поддержание хронического воспалительного процесса, развитие дисрегуляторного синдрома, а также типичные сезонные и суточные ритмы клинических симптомов язвенной болезни (ЯБ) развиваются на фоне повышения количества и активности EC_1 -клеток, продуцирующих серотонин (5-НТ) [3, 4]. Данная ассоциация не случайна, учитывая, что более 80% всего серотонина в организме продуцируется в ЖКТ, а основным источником его энтерального пула являются энтерохромаффинные клетки слизистой оболочки [5]. Многолетние исследования позволили выяснить, что 5-НТ – не только нейротрансмиттер, влияющий на активность нейронов в структурах лимбической системы, аппетит, эмоциональный статус, поведенческие реакции и качество жизни пациентов, но также является важнейшим модулятором функциональной активности и межклеточных коопераций в разных отделах ЖКТ [6]. Серотонин играет важную

роль в регуляции моторики ЖКТ, секреции соляной кислоты, транспорте хлора в кишке, энтеральной продукции бикарбонатов [1]. В ДПК усиление продукции серотонина обеспечивает реализацию компенсаторно-приспособительных реакций в виде усиления слизисто-бикарбонатной секреции и моторики при действии ульцерогенов [2]. Помимо этого серотонин, продуцируемый в ЖКТ, может депонироваться в тромбоцитах, индуцировать их агрегацию, а также является мощным иммуномодулятором, регулирующим миграцию, фагоцитоз и цитокиновую продукцию лейкоцитов [4]. На сегодняшний день мало известно о роли серотонина в патогенезе ЯБ, не изучена роль 5-НТ в регуляции системы гемостаза при острых язвенных кровотечениях, мало информации об эффектах 5-НТ на функциональный статус лейкоцитов, реализующих острый воспалительный ответ и иммунные реакции в ответ на повреждение. Во многом анализ механизмов данного феномена затруднен наличием широкого спектра клеточных мишеней и многочисленных рецепторов к 5-НТ, многофакторностью системы регуляции гемостаза и сопряженностью системы свертывания крови с воспалительным ответом организма на повреждение.

Цель исследования. Изучить роль серотонина и рецепторов 5-НТ в детерминации функционального состояния форменных элементов крови при остром кровотечении из язвенных дефектов ДПК.

Материал и методы. Проведен анализ функционального состояния тромбоцитов, нейтрофилов (Нф) и моноцитов (Мц), выделенных из крови 24 больных ЯБ ДПК, осложненной острым кровотечением. Для анализа отобраны пациенты со сходным объемом кровопотери (средней степени тяжести) и размерами язв (1,5-1,0 см), оцененными при эндоскопическом исследовании. Контрольную группу составили 5 добровольцев сходного возраста, не страдающие патологией ДПК. Анализ функционального состояния тромбоцитов включал: оценку спонтанной агрегации (при добавлении 0,1 мл физиологического раствора), определение эффективной концентрации 5-НТ (EC_{50}), вызывающей 50% агрегации тромбоцитов (АТ) на основании оценки кривой доза-ответ при добавлении в инкубационную смесь 0,25-1,5 мкМ 5-НТ. Затем оценивали эффект ингибитора 5-НТ₂ рецепторов (ритансерин, 10^7 М) [7]. Пробы инкубировали при 20°C в течение 8-9 мин, после чего определяли степень изменения АТ модифицированным методом G.Vorn путем измерения оптической плотности светового потока, проходящего через суспензию клеток, на спектрофотометре СФ-56. Результаты выражали в процентах относительно спонтанного и индуцированного 5-НТ уровня АТ. Нф и Мц выделяли методом градиентного центрифугирования [7]. Взвесь Нф после отмывания разводили средой 199 до концентрации 5×10^6 клеток в 1 мл. Для получения активированных Нф в пробирку вносили взвесь частиц полистерольного латекса (10^8 частиц на 1 мл суспензии Нф, инкубация в течение 1 ч при 37°C). Выделенные Мц отмывали забуференным изотоническим раствором NaCl и ресуспендировали в бессывороточной культуральной среде RPMI 1640 [3]. Прилипшие к пластику мононуклеарные клетки выделяли после 3-часовой инкубации в луночном планшете ("Flow Lab") с использованием CO₂-инкубатора. Клетки из расчета 10^6 на лунку помещали в 96-луночный планшет в 200 мкл среды: 1-я лунка была контрольной, во 2-й оценивали эффект ЛПС (0,3 мкг/мл; E.coli фирмы "Calbiochem", США); в 3-ю и 4-ю лунки добавляли блокаторы 5-НТ₂-рецепторов (ритансе-

рин 100 нМ) и 5-НТ₄-рецепторов (GR113808 – 200 нМ). Оценку функционального состояния Нф и Мц проводили по показателям кислород-зависимого метаболизма с помощью НСТ-теста [3]. При учете реакции микроскопически определяли процент НСТ-положительных клеток и учитывали интенсивность реакции по формуле: интенсивность НСТ = $Ax^3 + Bx^2 + Cx + 1/100$, где А, В и С соответствовали числу клеток с отложением диформаза, превышающим размеры ядра, занимающим более 1/3 площади цитоплазмы и занимающим менее 1/3 площади. Рассчитывали функциональный резерв (ФР), который определяли как коэффициент наглядности различий между индуцированной и спонтанной НСТ-реакцией. При статистической обработке данных анализ различий между исследованными группами больных и контрольной группой проводили проверку вариационных рядов на нормальность распределения. В случае, когда гипотеза нормальности отвергалась, использовали непараметрические критерии Уилкоксона-Манна-Уитни (Р_У). В остальных случаях использовали критерий Стьюдента и парный Т-критерий [8].

Результаты исследования и их обсуждение. У контрольных лиц, не страдающих ЯБ, EC_{50} 5-НТ составила $1 \pm 0,15$ мкМ. Добавление блокатора 5-НТ₂ рецепторов отменяло индуцированную АТ (на $85,8 \pm 2,2\%$), что подтверждало роль данного типа рецепторов в агрегационном ответе тромбоцитов на 5-НТ. Анализ НСТ лейкоцитов показал, что в неактивированных Нф и Мц периферической крови интенсивность НСТ составила соответственно $0,561 \pm 0,032$ и $0,782 \pm 0,041$. Добавление латекса повышало кислород-зависимый метаболизм Нф практически в 2 раза (до $1,65 \pm 0,67$), тогда как ответ Мц на ЛПС был более значимым (интенсивность НСТ возросла до $2,678 \pm 0,21$). Это свидетельствует о высоком функциональном резерве кислород-зависимого метаболизма Нф и Мц крови у здоровых лиц.

У больных с острыми кровотечениями отмечено повышение спонтанной АТ до $30,2 \pm 7,2\%$. Проагрегантное состояние тромбоцитов сопровождалось 4-кратным снижением EC_{50} серотонина ($0,25 \pm 0,13$ мкМ; $p < 0,001$), что может отражать изменения в системе внутриклеточной сигнализации тромбоцитов и/или чувствительности рецепторов. Добавление селективного ингибитора 5-НТ₂ рецепторов снижало индуцированную АТ на 58,8% ($p < 0,01$). Этот эффект был

менее выраженным, чем в контроле, однако сопровождался снижением АТ до $21,4 \pm 2,1\%$, то есть до величины, меньшей, чем спонтанная АТ. Учитывая, что эффекты активации 5-НТ₂ типа рецепторов опосредованы системой фосфатидил-инозитола и инозитол-3 фосфата, жестко сопряженных с Ca²⁺-гомеостазом [7], данный факт объясняет повышение спонтанной и индуцированной АТ, а также может быть результатом освобождения серотонина из тромбоцитов при остром язвенном кровотечении.

При анализе состояния Нф выявлено повышение интенсивности спонтанной НСТ на 58,9% по сравнению с контролем ($p < 0,01$), что свидетельствует об активации механизмов респираторного взрыва в полиморфноядерных лейкоцитах периферической крови. Однако индуцированная НСТ оказалась ниже показателя у здоровых лиц, что отражало снижение функционального резерва Нф у больных с ЯБ ДПК. Если в контрольной группе ФР нейтрофилов составлял $194 \pm 22,3\%$, то в основной группе данный показатель достигал лишь $74,61 \pm 3,2\%$. При этом добавление блокатора 5-НТ₂ рецепторов позволило выявить повышение роли серотонина в модуляции функциональной активности Нф. Если у здоровых лиц блокада 5-НТ₂ рецепторов снижала интенсивность НСТ на 15,1% ($p < 0,05$) по сравнению с индуцированным уровнем, то в основной группе ингибирующий эффект выключения 5-НТ₂ рецепторов достигал 35,4% ($p < 0,01$). Таким образом, в условиях язвенного кровотечения имеет место повышение чувствительности 5-НТ₂ рецепторов. Активация данных рецепторов стимулирует адгезию, миграционную активность Нф и продукцию ими провоспалительных цитокинов, в частности ИЛ-1β и ФНОα. Кроме того, доказана роль 5-НТ₂ рецепторов в рекрутировании эозинофилов и дегрануляции тучных клеток в зоне повреждения, обеспечивая реализацию острого воспалительного ответа на повреждение [2].

Изучение функционального состояния Мц крови выявило сходную закономерность – повышение спонтанной, но ограничение стимулированной интенсивности НСТ-реакции. Важно подчеркнуть значимое снижение ЛПС-стимулированной интенсивности НСТ. Данный показатель был на 35,8% ниже ($p < 0,01$), чем у здоровых лиц, вероятно, отражая толерантность Мц к действию бактериального фактора. За счет этого

ФР Мц у пациентов с язвенными кровотечениями оказался резко сниженным. Если в контрольной группе данный показатель составлял $239 \pm 42,2\%$, то в условиях острого язвенного кровотечения он достигал лишь $26,87 \pm 14,6\%$. Данный факт может быть отражением глубины дисфункции Мц и иммуносупрессии, ассоциированной с инфицированием организма *H. pylori* и хроническим воспалительным процессом в гастродуоденальной области. Учитывая, что в физиологических условиях активированные Мц-макрофаги секретуют цитокины – ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8/СХСЛ8, ИЛ-10, ИЛ-12p40, ИЛ-18, ФНОα [5], можно полагать, что ограничение эффективности активирующего сигнала – ЛПС не сопровождается адекватной цитокиновой секрецией, что может отражаться на функциональном состоянии Нф и лимфоцитов.

Анализ эффектов блокаторов 5-НТ-рецепторов позволил выявить особенности Мц на серотонин в условиях язвенного кровотечения, а также вариабельность чувствительности 5-НТ₂ и 5-НТ₄ рецепторов у больных, вероятно отражающие индивидуальную реактивность организма. Так, блокатор 5-НТ₂ рецепторов снижал интенсивность НСТ-реакции на $22,8 \pm 2,9\%$ по отношению к индуцированной НСТ ($p < 0,01$). Данный эффект оказался на 47,2% выше такового у здоровых лиц ($p < 0,01$), свидетельствуя о повышении чувствительности 5-НТ₂ рецепторов. Возможно, этот феномен отражает усиление Ca²⁺-зависимых механизмов активации Мц, опосредующих процессы созревания и цитокиновой секреции макрофагов и дендритных клеток (ДК), продукцию хемокинов (СХСЛ10/ІР-10 и ССL22/VDC) и механизмов рекрутирования лейкоцитов в зону альтерации [4]. Однако анализ функционального состояния Мц был бы неполным без оценки 5-НТ₄ типа рецепторов. Известно, что активация 5-НТ₁ и 5-НТ₂ рецепторов стимулирует хемотаксис Мц и незрелых ДК, тогда как иммуотропная активность ДК и макрофагов зависит во многом от экспрессии и активации 5-НТ₄. Оценка чувствительности рецепторов Мц у пациентов с язвенными кровотечениями выявила снижение модулирующего эффекта блокатора 5-НТ₄ рецепторов. При этом показательным оказался коэффициент отношения эффектов блокаторов 5-НТ₂ и 5-НТ₄ рецепторов. У здоровых людей данный показатель составлял $1,8 \pm 0,08$, в то время как в основной группе воз-

растал до $3,5 \pm 0,5$ ($p < 0,001$), отражая превалирование эффектов 5-НТ₂ рецепторов. Поскольку 5-НТ₄ рецепторы ассоциированы с активацией аденилатциклазы (АЦ) и повышением уровня цАМФ [2], можно предположить, что в условиях острого язвенного кровотечения нарушается чувствительность 5-НТ₄ рецепторов и/или активности АЦ-цАМФ.

Выводы и перспективы дальнейших исследований. 1. Проведенные исследования свидетельствуют об изменении функционального состояния форменных элементов крови при остром кровотечении из дуоденальных язв.

Проагрегантное состояние тромбоцитов связано с нарушением внутриклеточного Ca²⁺-гомеостаза и повышением чувствительности 5-НТ₂ рецепторов. 2. Повышение спонтанной НСТ-реакции в нейтрофилах и моноцитах сопровождается ограничением функционального резерва на фоне гиперчувствительности 5-НТ₂ и снижения чувствительности 5-НТ₄. 3. Выяснение эффектов серотонина и других БАВ на цитокиновую секрецию макрофагов позволит определить ключевые молекулярные механизмы нарушения иммунологической реактивности организма и дисрегенерации при язвенной болезни.

Литература

1. Рапопорт С.И. Язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки: морфофункциональные, нейроэндокринные и клинические параллели / С.И.Рапопорт, Н.И.Жернакова, К.И.Процаев // *Клин. мед.* – 2008. – № 5. – С. 28-30.
2. *New molecular mechanisms of duodenal ulceration* / S.Szabo, X.Deng, T.Khomenko, L.Chen // *Ann. N-Y Acad. Sci.* – 2007. – Vol. 113. – P. 238-255.
3. Фрейдлин И.С. Методы изучения фагоцитарных клеток при оценке иммунного статуса человека / Фрейдлин И.С. – М.: Медицина, 1986. – 284 с.
4. *Wallace J.L. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defence* / J.L.Wallace, D.N.Granger // *FASEB J.* – 1996. – Vol. 10. – P. 731-740.
5. *Martin G.R. Gastrointestinal Inflammation: A Central Component of Mucosal Defense and Repair* / G.R.Martin, J.L.Wallace // *Exp. Biol. Med.* – 2006. – Vol. 231. – С. 130-137.
6. Циммерман Я.С. Этиология, патогенез и лечение язвенной болезни, ассоциированной с *Helicobacter pylori*-инфекцией: состояние проблемы и перспективы / Я.С.Циммерман // *Клин. мед.* – 2006. – № 3. – С. 9-17.
7. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики / Кишкун А.А. – М.: ГЭОТАР, 2007. – 800 с.
8. Лях Ю.Е. Основы компьютерной биостатистики / Ю.Е.Лях, В.Г.Гурьянов. – Донецк, 2006. – 211 с.

МОДУЛЯЦИЯ СЕРОТОНИНОМ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ОТВЕТА ТРОМБОЦИТОВ И ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ ОСТРОМ КРОВОТЕЧЕНИИ ИЗ ЯЗВ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ

Резюме. Для оценки роли серотонина в патогенезе осложнений язвенной болезни проведена оценка агрегации тромбоцитов и НСТ-реакции нейтрофилов (Нф) и моноцитов (Мц) у 24 пациентов с острыми кровотечениями из дуоденальных язв. Выявлено повышение спонтанной агрегации тромбоцитов и снижение EC₅₀ серотонина. Проагрегантное состояние тромбоцитов связано с нарушением внутриклеточного Ca²⁺-гомеостаза и повышением чувствительности 5-НТ₂ рецепторов. Выявлено усиление спонтанной НСТ-реакции в Нф и Мц при ограничении функционального резерва лейкоцитов.

Ключевые слова: язвенное кровотечение, серотонин, тромбоциты, лейкоциты.

SEROTONIN MODULATES FUNCTIONAL RESPONSE OF PLATELETS AND LEUKOCYTES IN CASE OF ACUTE BLEEDING IN PATIENTS WITH DUODENAL ULCERS

Abstract. To evaluate the role of serotonin in the pathogenesis of peptic ulcer complications an analysis of platelets aggregation and NBT-reaction of neutrophils (Np) and monocytes (Mc) have been evaluated in 24 patients with acute bleedings from duodenal ulcers. An increase of a spontaneous platelets aggregation and a decrease of serotonin EC₅₀ have been detected. The proaggregative condition of thrombocytes is connected with a disturbance of intracellular Ca²⁺-homeostasis and an increase of the sensitivity of 5-НТ₂ receptors. An intensification of spontaneous NBT-reaction in Nps and Mcs in the presence of a restriction of the functional reserve of leukocytes has been revealed.

Key words: ulcer bleeding, serotonin, platelets, leukocytes.

M.Gorky National Medical University (Donets'k)

Надійшла 15.02.2010 р.

Рецензент – проф. В.І.Шепітько (Полтава)